

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 347 854**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.1997 E 97915870 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **18.06.2014 EP 0938320**

54

Título: **Método que permite el uso de RNA extracelular extraído de plasma o suero para detectar, monitorizar o evaluar un cáncer**

30

Prioridad:
26.03.1996 US 14730 P

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
24.07.2014

73

Titular/es:
**KOPRESKI, MICHAEL S. (100.0%)
23 WELLINGTON DRIVE
LONG VALLEY NJ 07853-6115, US**

72

Inventor/es:
KOPRESKI, MICHAEL S.

74

Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 347 854 T5

DESCRIPCIÓN

Método que permite el uso de RNA extracelular extraído de plasma o suero para detectar, monitorizar o evaluar un cáncer

Antecedentes de la invención

5 El ácido ribonucleico (RNA) es esencial en los procesos que permiten la traducción del código genético para formar proteínas, necesarias para todas las funciones celulares, tanto en células normales como neoplásicas. Aunque el código genético existe estructuralmente como ácido desoxirribonucleico (DNA), es la función del RNA, que existe como los subtipos RNA de transferencia, RNA mensajero o RNA similar al mensajero y RNA ribosómico, la que transporta y traduce este código a los sitios celulares de la producción de proteínas. En el núcleo, este RNA puede existir además como ribonucleoproteínas (RNP) o en asociación con ellas. La patogénesis y regulación del cáncer depende de la traducción mediada por el RNA de códigos genéticos específicos, que con frecuencia reflejan los eventos mutacionales dentro de los oncogenes, para producir las proteínas implicadas en la proliferación, regulación y muerte celular. Además, otros RNA y sus proteínas traducidas, aunque no necesariamente las implicadas en la patogénesis o regulación neoplásica, pueden servir para definir las características reconocibles de neoplasmas particulares al ser expresadas elevada o inapropiadamente. Así, el reconocimiento del RNA específico puede permitir la identificación, detección, interferencia, monitorización o evaluación de cualquier neoplasma, benigno, maligno o pre-maligno, en seres humanos y animales. Por otra parte, puesto que el RNA puede ser creado repetidamente a partir de su molde de DNA, para un gen dado dentro de una célula, puede formarse un número sustancialmente mayor de moléculas de RNA asociadas que de moléculas de DNA. Por consiguiente, un ensayo basado en el RNA debe tener mayor sensibilidad y mayor utilidad clínica que un ensayo correspondiente basado en el DNA. Obsérvese que el término RNA significa ácido ribonucleico incluyendo los fragmentos de ácido ribonucleico que consisten en secuencias de ácido ribonucleico.

Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos basados en el RNA, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (abreviadamente en lo sucesivo RT-PCR por sus iniciales en inglés *reverse transcriptase polymerase chain reaction*), también conocida como reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa o RNA-PCR), amplificación de la señal de DNA ramificado y ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible, tal como la amplificación isoterma basada en secuencias de ácidos nucleicos (abreviadamente en lo sucesivo NASBA por la expresión inglesa *nucleic acid sequence based amplification*), han demostrado ser métodos altamente sensibles y específicos para detectar pequeños números de moléculas de RNA. Como tales, pueden usarse en ensayos directos de tejido neoplásico (1-3). Puesto que la sangre periférica se obtiene fácilmente de pacientes con cáncer y se sabe que las células cancerosas metastásicas circulan en la sangre de pacientes con cáncer avanzado, varios investigadores han usado recientemente la RT-PCR para detectar el RNA intracelular extraído de células cancerosas circulantes (4-7). Debe resaltarse que actualmente los investigadores aplican la RT-PCR para detectar el RNA intracelular extraído de una fracción predominantemente celular de sangre con el fin de demostrar la existencia de células cancerosas circulantes. La RT-PCR se aplica únicamente a la fracción celular de sangre obtenida de pacientes con cáncer, es decir, el sedimento celular o las células de la sangre completa. Antes del ensayo se desecha generalmente el plasma o fracción de suero de la sangre, que no se examina por separado. Puesto que dicho método de fracción celular se basa en la presencia de células cancerosas circulantes metastásicas, tiene un uso clínico limitado en pacientes con cánceres tempranos y no es útil en la detección de neoplasmas no invasivos o estados pre-maligno.

La invención descrita por esta solicitud de patente demuestra el uso nuevo del RNA, derivado de un tumor o asociado a un tumor de seres humanos o animales, encontrado circulando en el plasma o fracción de suero de la sangre, como medio para detectar, monitorizar o evaluar estados pre-malignos. Esta invención se basa en la aplicación de técnicas de extracción del RNA y ensayo de amplificación de ácidos nucleicos para detectar el RNA extracelular derivado de un tumor o asociado a un tumor que se encuentra circulando en el plasma o suero. En contraste con la detección del RNA relacionado con virus en plasma o suero y la detección del DNA asociado a tumores en plasma y suero, la detección del RNA humano o de mamíferos y particularmente el RNA derivado de, o asociado a un tumor, nunca ha sido detectado específicamente en el plasma o fracción de suero de la sangre usando una metodología de amplificación de ácidos nucleicos y por consiguiente representa un uso nuevo y no obvio de estos métodos de extracción de RNA y de estos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Puesto que esta invención no depende de la presencia de células cancerosas circulantes, es clínicamente aplicable a estados pre-malignos. Además, esta invención permite la detección de RNA en plasma y suero previamente congelado o conservado de cualquier otra forma, pudiendo así disponer para el análisis de los bancos de plasma y suero y aumentando por tanto su utilidad general.

El RNA derivado de un tumor o asociado a un tumor que está presente en el plasma y el suero puede existir en dos formas. La primera RNA extracelular y la segunda RNA intracelular extraíble de células que contaminan ocasionalmente el plasma o la fracción de suero. En la práctica, no es necesario diferenciar entre la forma intracelular y extracelular para detectar el RNA en el plasma o suero utilizando la invención y por tanto esta invención puede usarse para la detección de ambas formas. Los usos potenciales del RNA extracelular derivado de, o asociado a un tumor, no han sido obvios para la comunidad científica ni tampoco la aplicación de ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar el RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor. En

realidad, la propia existencia de RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor no ha sido obvio para la comunidad científica y generalmente se considera que no existe. En general se cree que las ribonucleasas del plasma degradan rápidamente cualquier RNA extracelular de mamífero que pudiera circular en la sangre, no pudiendo ser detectado (8). Komeda et al., por ejemplo, añadieron específicamente RNA libre a sangre completa obtenida de voluntarios normales, pero no pudieron detectar dicho RNA usando la PCR (54). Sin embargo, las nucleasas aparecen inhibidas en el plasma de los pacientes con cáncer (9). Además, el RNA extracelular, formando complejos con lípidos y proteolípidos, unido a proteínas o dentro de cuerpos apoptóticos, estaría protegido de las ribonucleasas. De este modo, aunque todavía sin definir, el RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor puede estar presente en el plasma o suero por medio de diversos mecanismos. El RNA extracelular podría ser segregado o diseminado por el tumor en forma de complejos de lipoproteínas (proteolípido)-RNA o lípido-RNA, podría encontrarse en los cuerpos apoptóticos circulantes derivados de las células tumorales apoptóticas, podría encontrarse en complejos de proteo-RNA liberados de células viables o moribundas que incluyen, o están asociadas a, ribonucleoproteínas o asociadas a otras proteínas, tal como galactina-3, o el RNA podría ser liberado por células necróticas y circular luego unido a proteínas normalmente presentes en el plasma. Adicionalmente, podría existir circulando en complejos de RNA-DNA incluyendo los asociados a ribonucleoproteínas y otros RNA nucleicos. Además, el RNA puede existir simultáneamente en varios de estos restos. Por ejemplo, el RNA puede encontrarse asociado a la ribonucleoproteína encontrada en los cuerpos apoptóticos proteolípidos. La presencia de RNA extracelular en el plasma o suero hace factible su detección por ensayo de amplificación de ácidos nucleicos.

Diversos estudios en la bibliografía respaldan la existencia del RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor. Se ha demostrado que el RNA está presente en la superficie celular de las células tumorales, por electroforesis (10), preparaciones de membranas (11) y liberación de P^{32} (12). La pérdida de vesículas de fosfolípidos por las células tumorales es un fenómeno bien descrito (13,14) y se ha demostrado que vesículas similares circulan en la sangre de pacientes con cáncer (15). Kamm y Smith utilizaron un método fluorimétrico para cuantificar las concentraciones de RNA en el plasma de individuos sanos (55). Rosi y sus colegas utilizaron espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución para demostrar moléculas de RNA complejadas con vesículas lipídicas que procedían de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano (16). Otra caracterización de estos complejos de lípidos-RNA demostró que las vesículas contenían adicionalmente triglicéridos, ésteres de colesterol, lípidos, oligopéptidos y fosfolípidos (17). Mountford et al. utilizaron espectroscopía de resonancia magnética para identificar un proteolípido en el plasma de una paciente con un neoplasma de ovario (18). Aunque otra evaluación del proteolípido utilizando el método del orcinol sugirió que estaba presente el RNA, no pudo confirmarse utilizando otros métodos. Wieczorek y asociados, utilizando espectrometría UV e hidrólisis por RNasas, afirmaron haber encontrado un complejo específico de RNA-proteolípido en el suero de pacientes con cáncer que no estaba presente en individuos sanos (19-20). El complejo tenía una composición invariable independientemente del tipo de cáncer. Wieczorek et al. fueron además capaces de detectar este complejo específico de RNA-proteolípido usando el DNA de un fago clonado en E. Coli e hibridado a RNA de suero neoplásico, un método claramente diferente del método de esta invención. A continuación se detectó el DNA por inmunoensayo (21). Sin embargo, el RNA encontrado en este complejo se describe como de 10 kilobases, que es tan grande para hacer cuestionable si esto representa verdaderamente el RNA descrito. Más recientemente, los complejos de nucleoproteínas que contienen DNA y RNA, que representan posiblemente elementos de sub-organulos, se aislaron de los núcleos de las células de linfomas (22). Sin embargo, no se demostró que estos complejos puedan estar dispersados extracelularmente. Otros complejos de ribonucleoproteínas se han asociados al RNA del oncogén c-myc (56).

Aunque generalmente se supone que el plasma y el suero están exentos de células, en la práctica, particularmente en condiciones de fraccionamiento clínico habitual, el plasma y el suero pueden estar ocasionalmente contaminados por células. Estas células contaminantes son fuente de RNA intracelular que es detectable por los métodos de la invención. Aunque el nivel de células contaminantes puede ser reducido por filtros o centrifugación a alta velocidad, estos métodos pueden reducir también el RNA extracelular, particularmente en los cuerpos apoptóticos más grandes. La utilidad clínica de la invención no depende de la separación adicional del RNA de plasma o suero en sus especies extracelular e intracelular.

Aunque no está relacionado con las reivindicaciones de esta patente, probablemente existe una analogía similar para la detección de RNA normal (RNA derivado de un tumor o asociado a un tumor) en plasma y suero. Con posterioridad a la presentación de la solicitud de esta patente provisional, el inventor ha demostrado que el RNA normal (RNA no derivado de tumores) podría ser detectado similarmente en el plasma o suero tanto de voluntarios sanos como de pacientes de cáncer utilizando métodos de extracción y métodos de amplificación como los descritos por esta invención. Los resultados cualitativos sugerían que el producto amplificado era superior al obtenido de pacientes con cáncer. Además, el uso de un filtro de 0,5 micrómetros antes de la amplificación redujo, pero no eliminó el RNA amplificable, coincidiendo con el RNA extracelular de tamaño variable, con posibles células contaminantes adicionales.

Aunque los métodos de extracción del RNA utilizados en esta invención habían sido usados previamente para extraer tanto RNA viral como RNA intracelular, no era obvia su aplicabilidad al RNA extracelular relacionado con un tumor o asociado a un tumor. Las características físicas de los complejos del RNA extracelular siguen siendo desconocidas y por tanto antes de la invención no se sabía si los métodos de extracción descritos podrían separar eficazmente el RNA extracelular de sus complejos proteolípidos, apoptóticos, vesiculares o unidos a proteínas. Esta

invención describe la aplicabilidad de estos métodos de extracción del RNA a la extracción del RNA extracelular del plasma o suero y por tanto describe un nuevo uso para estos métodos de extracción.

En resumen, esta invención describe un método por el que puede ser detectado RNA en plasma o suero y por tanto ser utilizado para la detección, monitorización o evaluación de estados pre-malignos. Este método utiliza ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar el RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor de seres humanos o animales, que circula en el plasma o suero. Los métodos de extracción descritos y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, incluyen, aunque sin limitación, RT-PCR, amplificación de señal de DNA ramificado, amplificación basada en la transcripción, reporteros de RNA amplificables, amplificación del DNA bumerán, activación por desplazamiento de cadenas, tecnología de sondas cíclicas, amplificación NASBA isoterma y otros ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible, no se han usado para la detección del RNA derivado de un tumor o asociado a un tumor, en el plasma o suero, reflejando la tendencia científica general de creer que el RNA extracelular de mamíferos no existe circulando en el plasma o suero, a pesar de los estudios aislados que apoyan lo contrario. Por tanto, esta invención representa tanto un método nuevo como no obvio de detectar, monitorizar y evaluar estados pre-malignos y una aplicación nueva y no evidente tanto de metodología de extracción del RNA como de ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Esta invención, como se describe a continuación comprende un procedimiento en múltiples etapas aplicado a plasma o suero que consiste en tres partes, consistiendo la etapa inicial (Parte A) en la extracción del RNA derivado de, o asociado a, un tumor del plasma o suero, una segunda etapa (Parte B) que implica la aplicación de un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos, en el que puede estar implicada la transcripción inversa del RNA en su cDNA, y la tercera etapa (Parte C) que implica una detección del producto amplificado. En la Parte B puede utilizarse cualquier ensayo de amplificación de ácidos nucleicos capaz de permitir la detección de pequeños números de moléculas de RNA o sus cDNA correspondientes. Igualmente, en la Parte C pueden utilizarse varios métodos de detección del producto amplificado, incluyendo aunque sin limitación, electroforesis en gel de agarosa, métodos de detección por ELISA, electroquimioluminiscencia, cromatografía de líquidos de alta resolución y métodos de transferencia de mancha inversa. Además, la Parte B y la Parte C pueden utilizar ensayos que permitan ensayos de RNA cualitativos o cuantitativos.

Esta invención mejora varios métodos descritos en la bibliografía, tales como el de la patente DE 3717212 (A1) que describe un procedimiento para investigar en un fluido biológico acelular la presencia de transcripciones celulares oncogénicas o sus fragmentos para analizar el cáncer. De acuerdo con el procedimiento de la patente DE 3717212 A1, a) el RNA se concentra o separa de un fluido biológico acelular en presencia permanente de un inhibidor eficaz de la RNasa, el RNA se desnaturaliza y, de esta forma, se inmoviliza sobre un sustrato sólido; b) el RNA se pone en contacto con muestras de DNA oncógenas marcadas para hibridarlo con el RNA, cuando está presente una secuencia complementaria y c) se analiza el producto para detectar la presencia del DNA marcado. Igualmente, la solicitud de patente WO 90/09456 A1 describe un procedimiento en el que, bajo el efecto constante de un inhibidor de RNasa, el RNA procedente de células cancerosas se concentra o separa de un fluido biológico acelular y a continuación se amplifica y detecta el RNA oncógeno. En los procedimientos, descritos tanto en la patente DE 3717212 (A1) como en la solicitud de patente WO 90/09456 A1, se requiere tratar previamente la sangre completa con un inhibidor de RNasa antes de separar el plasma de la fracción celular de la sangre.

El método de la presente invención comprende la aplicación única de estos métodos a la detección del RNA extracelular derivado de, asociado a, un tumor en plasma o suero que hace nuevo a este invento. Esta invención proporciona un medio simple de ensayo de plasma o suero para detectar el RNA derivado de, o asociado a, un tumor, dando como resultado la identificación de pacientes portadores de células tumorales. Puesto que esta invención permite la detección de RNA extracelular y no depende de la presencia de células cancerosas circulantes, ofrece una selección sensible y económica para escrutar estados pre-malignos.

Objetos y aplicación de la invención

Por consiguiente el objeto de esta invención es detectar o inferir la presencia de células precancerosas a partir de cáncer no hematológico o hematológico, en un ser humano o animal, tanto en los individuos que se sabe que padecen cáncer como en los que no les ha sido diagnosticado previamente, examinando el plasma o fracción de suero de la sangre para detectar RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor, incluyendo aunque sin limitación, el que se deriva de oncogenes mutados, utilizando ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como, aunque sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), amplificación de señal de DNA ramificado, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) isotermas, otros ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible, amplificación basada en la transcripción, amplificación bumerán del DNA, activación por desplazamiento de cadenas, tecnología de sondas cíclicas y reporteros de RNA amplificable.

Una aplicación de esta invención es permitir la identificación o el análisis, cuantitativa o cualitativamente, del RNA derivado de, o asociado a, un tumor en el plasma o suero sanguíneo de seres humanos o animales durante o después de una intervención quirúrgica para eliminar lesiones pre-malignas y por consiguiente permitir la estratificación de dichos pacientes en cuanto a su riesgo de cáncer residual después de la cirugía.

Otra aplicación de esta invención es permitir la identificación o análisis, cuantitativa o cualitativamente, del RNA derivado de, o asociado a, un tumor en plasma o suero sanguíneo de seres humanos o animales que reciben terapias contra el cáncer, incluyendo aunque sin limitación, bioterapia, quimioterapia o radioterapia, como guía para

saber si se ha obtenido el efecto terapéutico adecuado o si se requiere una terapia alternativa y además para valorar la prognosis de estos pacientes.

5 Otra aplicación de esta invención es permitir la identificación o análisis, cuantitativa o cualitativamente, del RNA derivado de, o asociados a, un tumor en el plasma o suero sanguíneo de seres humanos o animales que han completado la terapia como un indicador temprano de la reaparición del cáncer, recidiva inminente o fracaso del tratamiento.

10 Otra aplicación de esta invención es permitir la identificación, por detección o inferencia, de la presencia de neoplasmas pre-malignos, incluyendo displasias o adenomas, por el examen de plasma o suero sanguíneo para detectar el ARN derivado de dichos neoplasmas o asociados a ellos. Además, el análisis, por ejemplo por un conjunto de ensayos para detectar diversos RNA, puede servir para distinguir estados malignos de pre-malignos, o ayudar en el control médico a detectar la transformación de un neoplasma en un cáncer declarado o detectar la regresión.

15 Por tanto, una aplicación de esta invención es proporcionar un método para seleccionar tanto individuos sin riesgo conocido como individuos con riesgo de estados malignos y además para definir el riesgo de cáncer cuando no se conoce este riesgo.

Otra aplicación de esta invención es permitir la identificación o el análisis, cuantitativa o cualitativamente del RNA derivado de, o asociado a un tumor, en el plasma o suero sanguíneo de seres humanos o animales nueva o recientemente diagnosticados de estado pre-maligno con el fin de establecer cuando se inicia la terapia, incluyendo las terapias adyuvantes.

20 Otra aplicación de esta invención es permitir la identificación o el análisis del RNA derivado de, o asociado a, un tumor, individualmente o por un panel de métodos que detecten el RNA variado, en el plasma o suero sanguíneo de seres humanos o animales con el fin de determinar las características específicas de un tumor de un paciente dado, como ayuda en el desarrollo de las terapias específicas para un paciente, como ayuda directa a un paciente dado en un régimen de tratamiento dado o como ayuda para predecir el pronóstico o comportamiento del tumor.

25 **Sumario de la invención**

Los objetos, ventajas y aplicaciones de la presente invención son alcanzados por el método descrito a continuación para detectar el RNA extracelular derivado de, o asociado, a un tumor en el plasma o suero sanguíneo de mamíferos: por (A) extracción del RNA del plasma o suero sanguíneo; (B) amplificación del RNA por análisis de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo (1) reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa, amplificación de señal del DNA ramificado, amplificación basada en la transcripción, reporteros de RNA amplificable, replicación Q-beta, amplificación bumerán del DNA, activación por desplazamiento de cadenas, tecnología de sondas cíclicas, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) isotermas y análisis de replicación de secuencias auto-sostenible. Los cebadores utilizados pueden seleccionarse por su capacidad para caracterizar el tumor; y (C) detección del RNA amplificado específico.

35 Este método de detección puede emplearse en diversos métodos de uso que incluyen la detección de neoplasmas pre-malignos y para la monitorización de pacientes durante la terapia de tratamiento y para la monitorización posoperatoria y para desarrollar estrategias apropiadas de tratamiento específico para cada paciente como se describe en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

40 En muchas circunstancias se prefiere la detección del RNA a la detección del DNA puesto que potencialmente está disponible un mayor número de moléculas de RNA, permitiendo así posiblemente una mayor sensibilidad. Además, puesto que la información genética del DNA natural es idéntica en todas las células somáticas de un individuo, la discriminación entre el DNA normal y el asociado a tumores depende de la presencia de una mutación. La detección del RNA, por la actividad realizada por el gen, permite poner de manifiesto un gen no mutado que se expresa inapropiadamente, como se observa típicamente en el cáncer. Por tanto, los métodos de amplificación del RNA proporcionan un modo para detectar la expresión del gen, tanto normal como mutado, que se activa en el cáncer. En un método de DNA para diferenciar individuos con cáncer de individuos normales, debe estar presente alguna mutación o transposición genética en los individuos con cáncer pero no en los normales. El proceso de la presente invención que utiliza RNA detectará igualmente el RNA mutante producido a partir de este DNA. Sin embargo, se detectan mejor los genes "normales" que se expresan inapropiadamente. Por consiguiente, comparándolos con los métodos que detectan el DNA, los métodos que detectan RNA proporcionan mayor versatilidad y aplicabilidad además de la mayor sensibilidad esperada.

55 Esta invención se refiere a un método para detectar o inferir la presencia de células pre-cancerosas, tanto de un cáncer no hematológico (es decir, tumor sólido) como de un cáncer hematológico, en un ser humano o animal por la combinación de tres etapas aplicadas a plasma o suero. La primera etapa (Parte A) implica la extracción del RNA derivado de, o asociado a, un tumor del plasma o suero sanguíneo. La segunda etapa (Parte B) aplica un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos al RNA extraído. En esta etapa, el RNA extraído puede ser sometido en primer

lugar a una transcripción inversa a cDNA antes de la amplificación del cDNA. La tercera etapa (Parte C) permite la detección del producto amplificado. Las Partes B y C pueden realizarse de modo que permitan la detección cualitativa o cuantitativa del RNA, dependiendo del objetivo o aplicación clínico último, como se describe en la presente memoria. En la Parte A pueden utilizarse varios métodos, como se describe a continuación. Igualmente, puede utilizarse en la Parte B cualquier ensayo de amplificación de ácidos nucleicos que pueda utilizarse en la detección de un pequeño número de moléculas de RNA o cDNA correspondientes, incluyendo pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), amplificación de señal de DNA ramificado, reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) isotermas, replicación Q-beta, amplificación basada en la transcripción, reporteros de RNA amplificable, amplificación de DNA bumerán, activación por desplazamiento de cadenas, tecnología de sondas cíclicas y otros ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible, así como variaciones de estos incluyendo métodos para el enriquecimiento de ácidos nucleicos, tal como utilizando digestión con enzimas de restricción con la reacción en cadena de la polimerasa y el uso de cebadores anidados. Igualmente, puede utilizarse en la Parte C cualquier método capaz de demostrar un producto de ácidos nucleicos amplificados incluyendo aunque sin limitación, electroforesis en gel de agarosa, métodos de detección por ELISA, electroquimioluminiscencia, cromatografía de líquidos de alta resolución y métodos de transferencia de mancha inversa. En esta invención, cualquiera de los diversos métodos de la Parte A puede combinarse con cualquier método aplicable en la Parte B, que puede a continuación combinarse con cualquier método aplicable en la Parte C. Es la nueva aplicación de estos métodos a la detección del RNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor en el plasma o suero sanguíneo de mamíferos, lo que hace nueva la invención. Varios métodos aplicables a cada una de las Parte A, Parte B y Parte C, se describirán con detalle a continuación como una descripción de la invención. De nuevo se insistirá que cualquier método de la Parte A puede combinarse con cualquier método en la Parte B, para seguir con cualquier método en la Parte C. Además, se debe poner de relieve que aunque puede definirse la contribución del RNA extracelular frente al RNA intracelular detectado en el plasma o suero, por ejemplo utilizando filtros o centrifugación a alta velocidad, no es un requisito de la invención dicha definición. Para los fines de la invención puede utilizarse plasma o suero sanguíneo "recientemente obtenido" o plasma o suero congelado (conservado) y posteriormente descongelado. El plasma o suero congelado (conservado) debe mantenerse óptimamente en condiciones de conservación de -20 a -70 grados centígrados hasta su descongelación y utilización. El plasma o suero "recientemente obtenido" debe refrigerarse o mantenerse en hielo hasta su utilización, realizándose la extracción de RNA tan pronto como sea posible.

Se extrae sangre por los métodos típicos en un tubo de recogida, preferiblemente de vidrio revestido con silicona, sin anticoagulante para la preparación de suero o con EDTA, citrato de sodio, heparina o anticoagulantes similares para la preparación del plasma. El método preferido si se prepara plasma o suero para su conservación, aunque no es un requisito absoluto, es que dicho plasma o suero sea fraccionado en primer lugar a partir de la sangre completa antes de ser congelado. Esto reduce la carga de RNA intracelular extraño liberado de la lisis de las células congeladas y descongeladas que podrían reducir la sensibilidad del análisis de amplificación o interferir con el ensayo de amplificación por la liberación de inhibidores a la PCR, tales como porfirinas y hematina. El plasma o suero "recientemente obtenido" puede ser fraccionado a partir de la sangre completa por centrifugación, utilizando preferiblemente centrifugación suave a 300-800 x g durante cinco a diez minutos, o ser fraccionado por otros métodos típicos. Deben evitarse las altas velocidades de centrifugación capaces de separar por fraccionamiento los cuerpos apoptóticos. Puesto que la heparina puede interferir con la RT-PCR, el uso de sangre heparinizada puede requerir un tratamiento previo con heparinasa como se describe en (23), seguido de la eliminación de calcio antes de la transcripción inversa, como se describe en (23). Por consiguiente, el EDTA es el anticoagulante preferido para muestras de sangre en las que se planea la amplificación por la PCR.

PARTE A: Extracción del RNA extracelular a partir de plasma o suero

En la Parte A, se pueden adaptar los métodos de extracción del RNA publicados anteriormente para la extracción del RNA intracelular de mamíferos o del RNA viral, tal como se han publicado o con modificación, para la extracción del RNA derivado de, o asociado a, un tumor del plasma y suero. El volumen de plasma o suero utilizado en la parte A puede variar dependiendo del propósito clínico, pero en esta parte son suficientes volúmenes de 100 microlitros a un mililitro de plasma o suero, indicándose con frecuencia los volúmenes mayores en casos de enfermedad mínima o pre-maligna. Por ejemplo:

Tanto el RNA extracelular como el RNA intracelular pueden extraerse del plasma o suero utilizando partículas de sílice, perlas de vidrio o diatomeas, como en el método o adaptaciones de Boom et al. (24). Se describe la aplicación del método adaptado por Cheung et al. (25):

Las partículas de sílice fraccionadas por tamaño se preparan poniendo en suspensión 60 gramos de dióxido de silicio (SiO₂, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en 500 mililitros de agua estéril doblemente destilada. A continuación se deja sedimentar la suspensión durante 24 horas a la temperatura ambiente. Se retiran por succión cuatrocientos treinta (430) mililitros del líquido sobrenadante y las partículas se vuelven a poner en suspensión en agua estéril doblemente destilada y desmineralizada añadida hasta igualar un volumen de 500 mililitros. Después de 5 horas más de sedimentación, se retiran por succión 440 mililitros del líquido sobrenadante y se añaden 600 microlitros de HCl (32% en peso/volumen) para ajustar la suspensión hasta pH 2. La suspensión se divide en partes alícuotas y se conserva en la oscuridad.

El tampón de lisis se prepara disolviendo 120 gramos de tiocianato de guanidina (GuSCN, Fluka Chemical, Buchs, Suiza) en 100 mililitros de Tris-hidrocloruro (Tris-HCl) 0,1 M (pH 6,4) y 22 mililitros de EDTA 0,2 M, ajustado a pH 8,0 con NaOH, y 2,6 gramos de Triton X-100 (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL). La solución se homogeniza a continuación.

- 5 El tampón de lavado se prepara disolviendo 120 gramos de tiocianato de guanidina (GuSCN) en 100 mililitros de Tris-HCl 0,1 M (pH 6,4).

Se mezclan de cien microlitros a doscientos cincuenta microlitros (requiriendo cantidades mayores en los casos de enfermedad mínima) de plasma o suero con 40 microlitros de suspensión de sílice preparada como anteriormente y con 900 microlitros de tampón de lisis, preparado como anteriormente, utilizando un mezclador Eppendorf 5432 durante 10 minutos a la temperatura ambiente. A continuación se centrifuga la mezcla a 12.000 x g durante un minuto y se aspira y desecha el líquido sobrenadante. A continuación se lava dos veces el sedimento de sílice-RNA con 450 microlitros de tampón de lavado, preparado como anteriormente. A continuación se lava dos veces el sedimento con un mililitro de etanol al 70% (vol/vol). A continuación se da un lavado final al sedimento con un mililitro de acetona y se seca en un bloque térmico a 56 grados centígrados durante diez minutos. El sedimento se vuelve a poner en suspensión en 20 a 50 microlitros de agua tratada con procarbonato de dietilo a 56 grados centígrados durante diez minutos para eluir el RNA. La muestra puede eluirse alternativamente durante diez minutos a 56 grados centígrados con un tampón TE que consiste en Tris-HCl 10 mM-EDTA 1 mM (pH 8,0) con un inhibidor de RNasa (RNasin, 0,5 U/microlitro, Promega), con o sin Proteinasa K (100 ng/ml) como se ha descrito por Boom et al. (26). Después de la elución, la muestra se centrifuga a continuación a 12.000 x g durante tres minutos y se recupera el líquido sobrenadante que contiene el RNA. El extracto de RNA se usa ahora en la Parte B.

Como método alternativo el RNA extracelular puede extraerse del plasma o suero en la Parte A utilizando el método de extracción con solución ácida de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo descrita por Chomczynski y Sacchi (27) como sigue:

25 La solución desnaturalizante consiste en tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de sodio 25 milimolar, pH 7,0, sarcosilo al 0,5% y 2-mercaptoetanol 0,1 M. La solución desnaturalizante se prepara como sigue: se prepara una solución madre disolviendo 250 gramos de tiocianato de guanidinio (GuSCN, Fluka Chemical) con 293 mililitros de agua estéril doblemente destilada y desmineralizada, 17,6 mililitros de citrato de sodio 0,75 M, pH 7,0 y 26,4 mililitros de sarcosilo al 10% a 65 grados centígrados. La solución desnaturalizante se prepara añadiendo 0,36 mililitros de 2-mercaptoetanol/50 mililitros de solución madre.

30 Se mezclan de 100 microlitros a 1 mililitro de plasma o suero con 1 mililitro de solución desnaturalizante. Secuencialmente se añaden 0,1 mililitro de acetato de sodio 2 M, pH 4,0, 1 mililitro de fenol y 0,2 mililitro de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), mezclando después de la adición de cada reactivo. La mezcla resultante se agita enérgicamente durante 10 segundos, se enfría con hielo durante 15 minutos y a continuación se centrifuga a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 grados centígrados. A continuación se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se mezcla con 1 mililitro de isopropanol. A continuación se enfría la mezcla a -20 grados centígrados durante 1-2 horas para precipitar el RNA. Después de centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos el sedimento de RNA resultante se disuelve en 0,3 mililitros de solución desnaturalizante y a continuación se vuelve a precipitar con 1 volumen de isopropanol a -20 grados centígrados durante una hora. Después de otra centrifugación a 10.000 x g durante diez minutos a 4 grados centígrados, se añade etanol al 75% para volver a poner en suspensión el sedimento de RNA, que a continuación se sedimenta y seca al vacío y luego se disuelve en 5-25 microlitros de SDS al 0,5% a 65 grados centígrados durante diez minutos. El extracto de RNA se usa ahora en la Parte B.

45 Como la realización preferida para la Parte A, y como un método alternativo, el RNA extracelular puede extraerse del plasma o suero en la Parte A utilizando variaciones del método de extracción con solución ácida de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. Por ejemplo, en la realización preferida el RNA se extrae del plasma o suero utilizando reactivo TRI, una solución monofásica de tiocianato de guanidina-fenol, como la descrita por Chomczynski (28). Se tratan de cien microlitros a un mililitro de plasma o suero utilizando un mililitro de Reactivo TRI(TM) (TRI Reagent, Sigma Trisolv(TM), BioTecx Laboratories, Houston, TX, TRIzol(TM), GIBCO BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, ISOGEN(TM), Nippon Gene, Toyama, Japan, RNA Stat(TM) 60, Tel-test, Friendsword, TX) siguiendo las indicaciones del fabricante. Pueden aplicarse adaptaciones menores como actualmente se realiza en la técnica. Así, se mezclan de cien microlitros a un mililitro de plasma o suero con un mililitro de Reactivo TRI. A continuación se mezclan 0,2 mililitros de cloroformo durante 15 segundos y la mezcla se deja reposar durante 3 minutos a la temperatura ambiente: a continuación se centrifuga la mezcla a 4 grados centígrados durante 15 minutos a 12.000 x g. Se retira la fase acuosa superior con la que se mezclan 0,5 mililitros de isopropanol y a continuación se deja a la temperatura ambiente durante cinco minutos, seguido de centrifugación a 4 grados centígrados durante diez minutos a 12.000 x g.

60 A continuación se lava el sedimento de RNA con 1 mililitro de etanol al 75% por centrifugación a 12.000 x g durante 5 minutos. El sedimento se seca al aire y se vuelve a poner en suspensión en 11,2 microlitros de agua exenta de RNAsa. La contaminación por polisacáridos y proteoglicanos, que pueden estar presentes en complejos extracelulares de proteolípido-RNA, puede reducirse por modificación de la etapa de precipitación del procedimiento con el Reactivo TRI(TM), como lo describen Chomczynski y Mackey (29), como sigue:

Se mezclan de cien microlitros a un mililitro de plasma o suero con Reactivo TRI(TM) siguiendo las instrucciones del fabricante, sometiendo la mezcla a separación de fases con cloroformo o bromocloropropano (30) y a centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos. Se retira la fase acuosa y se mezcla a continuación con 0,25 mililitros de isopropanol seguido de 0,25 mililitros de una solución de precipitación con alta concentración de sal (NaCl 1,2 M y citrato de sodio 0,8 M). La mezcla se centrifuga a 10.000 x g durante 5 minutos y se lava con 1 mililitro de etanol al 75%. A continuación el sedimento de RNA se seca a vacío y se disuelve luego en 5-25 microlitros de SDS al 0,5% a 65 grados centígrados durante diez minutos. El extracto de RNA se usa ahora en la Parte B.

En la Parte A pueden utilizarse métodos alternativos para extraer el RNA del plasma o suero, incluyendo aunque sin estar limitados a ellos centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, incluyendo el método descrito por Chirgwin et al. (31), y coprecipitación del RNA extracelular del plasma o suero con gelatina, tal como por adaptaciones del método de Fournie et al. (32) a la extracción del RNA.

El ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular circulante, incluyendo el DNA extracelular derivado de, o asociado a, un tumor, también está presente en el plasma y suero (33). Puesto que este DNA será además extraído en cantidades variables en los métodos de extracción del RNA antes descritos, puede ser deseable o necesario (dependiendo de los objetivos clínicos) purificar más el extracto de RNA y eliminar las trazas de DNA antes de pasar a la Parte B. Esto puede realizarse utilizando DNasa, por ejemplo por el método descrito por Rashtchian (34), como sigue:

A un microgramo de RNA, en un tubo de centrifuga de 0,5 mililitros colocado en hielo, añadir un microlitro de tampón de reacción 10 x DNasa 1 (Tris-HCl 200 µM (pH 8,4), KCl 500 micromolar, MgCl₂ 25 micromolar, BSA 1 µM por mililitro). A esto añadir una unidad de DNasa I (GIBCO/BRL, nº de catálogo 18068-015). A continuación llevar el volumen hasta diez microlitros con agua destilada tratada con DEPC y seguir por incubación a la temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se inactiva la DNasa I por adición de EDTA 20 milimolar a la mezcla y calentamiento durante 10 minutos a 65 grados centígrados. El RNA tratado puede pasar ahora directamente a la Parte B.

Alternativamente, los cebadores de la Parte B pueden construirse de modo que favorezcan la amplificación de los productos de RNA, pero no del DNA contaminante, tal como utilizando cebadores que abarquen las uniones de los empalmes en el RNA, o cebadores que abarquen un intrón. Métodos alternativos de amplificar el RNA pero no el DNA contaminante incluyen los métodos descritos por Moore et al. (35) y los métodos descritos por Buchman et al. (36), que emplean un oligonucleótido que contiene dU como cebador del adaptador.

PARTE B: Amplificación de ácidos nucleicos

En la Parte B, el RNA que ha sido extraído del plasma o suero durante la Parte A, o sus correspondiente cDNA, se amplifica usando cualquier ensayo de amplificación de ácidos nucleicos utilizado para la detección de bajos números de moléculas de RNA. Los ensayos aplicables incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa (37), amplificación de señal de DNA ramificado (38), reporteros de RNA amplificable, replicación Q-beta, amplificación basada en la transcripción, amplificación de DNA bumerán, activación por desplazamiento de cadenas, tecnología de sondas cíclicas, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos isoterma (NASBA) (39), y otros ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible. No es necesario modificar estos ensayos a partir de sus métodos publicados para la Parte B. Las publicaciones referenciadas se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para su descripción para realizar los diversos ensayos identificados en ellas. Es la aplicación de estos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos a la detección de RNA extracelular, derivado de, o asociado a, un tumor, en plasma o suero lo que hace nuevo su uso. La realización preferida para la Parte B usa la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Los cebadores usados en el ensayo de amplificación deben estar basados en el RNA de interés derivado de, o asociado a, un tumor que caracteriza el tumor. El RNA derivado de o asociado a un tumor incluye, pero sin limitación:

Los mRNA relacionados con oncogenes mutados o DNA mutado, una lista parcial de los cuales incluye H-ras, K-ras, N-ras, c-myc, her-2-neu, bcr-abl, fms, src, fos, sis, jun, erb-B-1, VHL, PML/RAR, AML1-ETO, EWS/FLI-1, EWS/ERG.

Los mRNA relacionados con genes supresores de tumores, una lista parcial de los cuales incluye p53, RB, MCC, APC, DCC, NF1, WT.

Los mRNA relacionados con una proteína asociada a un tumor que se encuentra niveles elevados en ciertos cánceres, una lista parcial de los cuales incluye: alfa-feto proteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), TAG-72, CA 19-9, CA-125, antígeno específico de la próstata (PSA), CD44, y HCG (gonadotropina coriónica humana).

Los mRNA relacionados con una proteína relacionada con un tumor no encontrada normalmente circulando en la sangre, una lista parcial de los cuales incluye mRNA de tirosinasa, mRNA de queratina 19.

Los mRNA relacionados con antígenos específicos de tumores, tales como MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, GP-100 y MAGE 6, MUC 18, P97.

5 Los mRNA o RNA similares a mensajeros asociados a ribonucleoproteínas y los RNA dentro de ribonucleoproteínas, una lista parcial de los cuales incluye RNA de telomerasa, y RNA asociado con complejos de ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hn RNP-A1) y A2/B1 (hn RNP-A2/B1), y ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hn RNP-K), tal como RNA del oncogén c-myc, además de los RNA previamente descritos anteriormente cuando están asociados con ribonucleoproteína.

Por ejemplo, las secuencias de cebadores oligonucleotídicos para el transcrito bcr-abl pueden ser como sigue (40):

Cebador 1 en la localización M-bcr:

10 (5'-TGGAGCTGCAGATGCTGACCAACTCG-3').

Cebador 2 en la localización abl del exón II:

(5'-ATCTCCACTGGCCACAAAATCATACA-3').

Cebador 3 en la localización M-bcr:

(5'-GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC-3').

15 Cebador 4 en la localización abl del exón III:

(5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3').

El ensayo RT-PCR anidado (interno) proporciona un producto de 305 o 234 pares de bases, dependiendo de la expresión del exón bcr 3.

20 Como otro ejemplo, los cebadores anidados para la amplificación de cDNA de tirosinasa humana pueden ser como sigue (41):

Cebador 1 (externo, sentido) - (5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3')

Cebador 2 externo, anti-sentido) - (5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3')

Cebador 3 (anidado, sentido) - (5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3')

Cebador 4 (anidado, anti-sentido) - (5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3')

25 Los cebadores externos dan como resultado un producto de amplificación por PCR de 284 pares de bases, y los cebadores anidados (internos) dan como resultado un fragmento de 207 pares de bases.

Las secuencias preferidas de cebador de oligonucleótidos para mRNA específicos relacionados con un tumor o asociados a un tumor están previamente publicadas, siendo las publicaciones referenciadas incorporadas en la presente memoria como referencias en su totalidad.

30 Algunos, pero no todos, de los ensayos de amplificación requieren transcripción del RNA a cDNA con transcriptasa inversa. Como se ha indicado, el método de transcripción inversa y amplificación puede ser realizado por los métodos previamente publicados o recomendados, cuyas publicaciones referenciadas se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad, y no se requiere modificación más allá de las etapas que se describen en la Parte A. Se pueden usar varias transcriptasas inversas, incluyendo, pero sin limitación, MMLV RT, mutantes RNasa H de MMLV RT, tales como SuperScript y Superscript II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), AMV RT, y transcriptasa inversa termoestable de Thermus Thermophilus. Por ejemplo, un método, aunque no el único método, que puede usarse para convertir RNA extraído de plasma o suero en la Parte A en cDNA es el protocolo adaptado del sistema de preamplificación Superscript II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD; n° de catálogo 18089-011), como se describe por Rashtchian (34), adaptado como sigue:

40 1-5 microgramos de RNA extraído de plasma o suero en la Parte A en 13 microlitros de agua tratada con DEPC se añade un tubo de microcentrifuga limpio. Luego se añade un microlitro de oligo (dT) (0,5 miligramos/mililitro) o solución de hexámero al azar (50 ng/microlitro) y se mezcla suavemente. La mezcla se calienta luego a 70 grados centígrados durante 10 minutos y luego se incuba en hielo durante un minuto. A continuación, se centrifuga brevemente seguido por la adición de 2 microlitros de 10 x tampón de síntesis (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM, cloruro de magnesio 25 mM, un miligramo/mililitro de BSA), un microlitro de 10 mM cada uno de mezcla de dNTP, 2 microlitros de DTT 0,1 M, un microlitro de Superscript II RT (200 U/microlitro) (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Después de mezcla suave, la mezcla de reacción se recoge por breve centrifugación, y se incuba a temperatura ambiente durante diez minutos. El tubo se transfiere luego a un baño de agua a 42 grados centígrados o un bloque caliente y se incuba durante 50 minutos. La reacción se termina luego incubando el tubo a 70 grados centígrados durante 15 minutos, y luego se coloca en hielo. La mezcla de reacción es recogida por breve

centrifugación, y se añade un microlitro de RNasa H (2 unidades) seguido por incubación a 37 grados centígrados durante 20 minutos antes de proceder a la amplificación de ácidos nucleicos.

La amplificación de ácidos nucleicos transcurre como sigue:

5 A una mezcla de cDNA se añade lo siguiente: 8 microlitros de 10 x tampón de síntesis (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM, cloruro de magnesio 25 mM, 1 mg/ml of BSA), 68 microlitros de agua estéril doblemente destilada, un microlitro de cebador de amplificación 1 (10 micromolar), un microlitro de cebador de amplificación 2 (10 micromolar), un microlitro de DNA-polimerasa de Taq (2-5 U/microlitro). Mezclar suavemente y recubrir la mezcla de reacción con aceite mineral. La mezcla se calienta a 94 grados centígrados durante 5 minutos para desnaturalizar los híbridos RNA/cDNA remanentes. La amplificación por PCR se realiza luego en un aparato de ciclo térmico automatizado durante 15-50 ciclos, a 94 grados centígrados durante un minuto, 55 grados centígrados durante 30 a 10 90 segundos, y 72 grados centígrados durante 2 minutos. El producto de PCR amplificado se detecta luego en la Parte C.

Además si los cebadores contienen sitios de restricción apropiados, la digestión por restricción puede ser realizada en el producto amplificado para permitir más discriminación entre secuencias de tipo mutante y de tipo natural.

15 Los parámetros del ciclo térmico y la concentración de magnesio pueden variar dependiendo del caso específico. Por ejemplo, un método alternativo que usa cebadores anidados útil para la detección de mRNA de tirosinasa humana en la Parte B es el método descrito por Smith et al. (4), como sigue:

20 Las secuencias de cebador son como se han descrito anteriormente para la tirosinasa humana. Diez microlitros de RNA extraído en la Parte A de plasma o suero se tratan por transcripción inversa calentando a 90 grados centígrados durante 4 minutos, enfriando rápidamente, y diluyendo a 20 microlitros con una mezcla que consiste en 1 x de tampón para PCR (Tris-HCl 10 mmol/litro, pH 8,4, 50 mmol/litro de KCl, 100 microgramos/mililitro de gelatina), 8 mmol/litro de cloruro de magnesio, 1 mmol/litro de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 25 pmol de cebador de tirosinasa 2 (como se ha descrito previamente), 20 unidades de "RNA guard" (Farmacia), y 4 unidades de transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina Moloney (Farmacia). La mezcla total se incuba luego a 37 25 grados centígrados durante una hora, la mitad de la muestra se elimina, y se diluye a 50 microlitros que contienen 1 x tampón para PCR, 200 micromol/litro cada uno de dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 1,6 mmol/litros de cloruro de magnesio, 150 pmol de cebador 1 y cebador 2, Triton X-100 al 0,1%, y 1 unidad de DNA-polimerasa de Taq (Promega). La mezcla se cubre con aceite, y se calienta a 95 grados centígrados durante 5 minutos, seguido por 30 30 ciclos de PCR en un aparato de ciclo térmico a 95 grados centígrados durante 65 segundos, 55 grados centígrados durante 65 segundos, y 72 grados centígrados durante 50 segundos. Los productos se vuelven a amplificar con el cebador 3 anidado y el cebador 4 anidado usando 5 microlitros en una dilución 1:100. Estos fueron amplificados en un volumen de reacción de 25 microlitros durante 30 ciclos adicionales. Este producto de PCR amplificado final se detecta ahora en la Parte C, ya sea siendo sometidos a electroforesis en un gel de agarosa o por otro método.

35 Las realizaciones preferidas para la amplificación de la Parte B RNA relacionado con un tumor o asociado a un tumor, que incluyen cebadores específicos, método de transcripción inversa, y el método de RT-PCR, se describen en las publicaciones referenciadas que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para su descripción para realizar los diversos ensayos identificados en ellas.

Para la amplificación de mRNA de tirosinasa de la Parte B, un mRNA asociado con melanoma maligno, el método preferido es el de Brossart et al. (41).

40 Para la amplificación de mRNA de queratina 19 de la Parte B, un mRNA asociado con el cáncer de mama y otras malignidades epiteliales, el método preferido es el de Datta et al. (5).

Para la amplificación de mRNA de antígeno específico de la próstata (PSA) de la Parte B, un mRNA asociado con cáncer de próstata, el método preferido es el de Katz et al. (72).

45 Para la amplificación de mRNA de alfa-fetoproteína (AFP) de la Parte, un mRNA asociado con carcinoma hepatocelular, cáncer de testículo, y otros cánceres, el método preferido es el de Komeda et al. (54).

Para la amplificación de mRNA de BCR/abl de la Parte B, un mRNA asociado con leucemia mieloide crónica (CML), el método preferido es el de Stock et al. (57), o alternativamente, por el método de Edmonds et al. (40).

Para la amplificación de mRNA de antígeno carcinoembrionario (CEA) de la Parte B, un mRNA asociado con cánceres gastrointestinales y cáncer de mama, el método preferido es el de Gerhard et al. (58).

50 Para la amplificación de mRNA de P97 de la Parte B, un mRNA asociado con melanoma maligno, el método preferido es el de Hoon et al. (59).

Para la amplificación de mRNA de MUC 18 de la Parte B, un RNA asociado con melanoma maligno, el método preferido es el de Hoon et al. (59).

Para la amplificación de mRNA de PML/RAR- α de la Parte B, un mRNA asociado con la leucemia promielocítica aguda, el método preferido es el de Miller et al. (60).

Para la amplificación de mRNA de CD44 de la Parte B, un mRNA asociado con cáncer de pulmón, el método preferido es el de Penno et al. (61).

- 5 Para la amplificación de mRNA de EWS/FLI-1 de la Parte B, un mRNA asociado con el sarcoma de Ewing y otros tumores de Ewing, el método preferido es el de Pflieger et al. (62).

Para la amplificación de mRNA de EWS/ERG de la Parte B, un mRNA asociado con sarcoma de Ewing y otros tumores de Ewing, el método preferido es el de Pflieger et al. (62).

- 10 Para la amplificación de mRNA de AML1/ETO de la Parte B, un mRNA asociado con la leucemia mielógena aguda, el método preferido es el de Maruyama et al. (63).

Para la amplificación de mRNA de MAGE de la Parte B, un mRNA, que incluye mRNA de MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 y MAGE-4, que están asociados con cáncer de vejiga, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, y otros, el método preferido es el de Patard et al. (64).

- 15 Para la amplificación de mRNA de beta-gonadotropina coriónica humana de la Parte B, un mRNA asociado con melanoma maligno, tumores de las células germinales, y otros cánceres, el método preferido es el de Doi et al. (65).

Para la amplificación de RNA asociado a telomerasa humana de la Parte B, el método preferido es por aplicación del método TRAP PCR como se describe por Kim et al. (69). Alternativamente, se pueden usar otros métodos de amplificación como se describen en la presente memoria, en donde la selección del cebador se diseña basándose en la secuencia molde de la telomerasa como se describe por Feng et al (76).

- 20 Métodos alternativos de amplificación de ácidos nucleicos que se pueden usar en la Parte B incluyen otras variaciones de la RT-PCR, incluyendo la RT-PCR cuantitativa, por ejemplo como la adaptada al métodos descrito por Wang et al. (43) o por Karet et al. (44).

- 25 Un método alternativo de amplificación de ácidos nucleicos que se puede usar en la Parte B es la reacción en cadena de la ligasa (66). El RNA extracelular extraído del plasma o suero en la Parte A se debe someter a transcriptasa inversa para obtener cDNA. Se seleccionan cebadores oligonucleotídicos que caen directamente en el sitio del cDNA interés. Si está presente un sitio de mutación, los oligonucleótidos que son complementarios al sitio se hace que contengan la mutación solamente en su extremo 3', excluyendo la hibridación de DNA de tipo natural no mutado. Los sitios de restricción también pueden ser utilizados para discriminar entre secuencias mutantes y de tipo natural, si es necesario.

- 30 Un método alternativo de cualquier amplificación cualitativa o cuantitativa de ácidos nucleicos que se puede usar en la Parte B es la amplificación de señal de DNA ramificado, por ejemplo como el adaptado al método descrito por Urdea et al. (38), con modificación de la referencia como sigue: el plasma o suero sólo debe ser centrifugado a baja velocidad, como se ha indica previamente. El RNA extracelular se extrae luego del plasma o suero como se describe en la Parte A, y luego se añade directamente a los micropocillos. El método para la detección de RNA relacionado con un tumor o asociado a un tumor transcurre como se indica en la referencia (38), con las sondas dianas específicas para el RNA o cDNA de interés relacionado con un tumor o asociado con un tumor, y con emisión de luz quimioluminiscente proporcional a la cantidad de RNA asociado a un tumor en la muestra de plasma o suero. Los aspectos específicos del método referenciado están descritos adicionalmente por Urdea et al (71), incorporándose esta referencia en su totalidad.

- 40 Un método alternativo de amplificación cualitativa o cuantitativa de ácidos nucleicos que puede usarse en la Parte B es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos isoterma (NASBA), por ejemplo, como la adaptada al método descrito por Kievits et al. (39), o por Vandamme et al. (45). El método de Sooknanan et al. (67) puede usarse para la detección y cuantificación de mRNA de BCR/ABL.

- 45 Métodos alternativos de amplificación cualitativa o cuantitativa de ácidos nucleicos que se pueden usar en la Parte B incluyen, pero sin limitación, replicación Q-beta, otros ensayos de replicación de secuencias auto-sostenible, amplificación basada en la transcripción, y reporteros de RNA amplificables, amplificación de DNA bumerán, activación por desplazamiento de cadenas y tecnología de sonda cíclica.

El producto amplificado de la Parte B se detecta a continuación en la Parte C. Dependiendo del método de detección usado en la Parte C, los cebadores pueden necesitar estar biotinilados o modificados de otro modo en la Parte B.

- 50 Parte C: Detección del producto amplificado

Existen numerosos métodos para detectar el producto de un ácido nucleico amplificado, cualquiera de los cuales se puede emplear en la Parte C para detectar el producto amplificado de la Parte B. Las publicaciones referenciadas, incluyendo las que pertenecen a la detección de RNA específico relacionado o asociado con un tumor o su correspondiente cDNA como se ha citado previamente, y las que pertenecen a RNA o su correspondiente detección

de cDNA como sigue, se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para las descripciones para realizar los diversos ensayos identificados en las mismas.

5 En el método preferido, el producto amplificado se detecta en la Parte C usando electroforesis en gel. En la realización preferida, 25 microlitros de producto amplificado (o pos-amplificado digerido) se somete a electroforesis a través de un gel de agarosa al 3% en 1 x TBE a 75 voltios de corriente continua (VDC). La electroforesis se lleva a cabo durante una a dos horas antes de teñir con bromuro de etidio. Como una alternativa al bromuro de etidio, el producto amplificado se puede transferir desde el gel a una membrana mediante técnicas de transferencia para ser detectado con una sonda marcada (46).

10 Un método alternativo que se puede usar en la Parte C para detectar el producto amplificado de la Parte B es detección por ELISA. Dependiendo del método de detección por ELISA usado, puede ser necesario biotinar o modificar de otro modo los cebadores usados en la Parte B.

Por ejemplo, un método de detección por ELISA que se puede usar en la Parte C es el método descrito por Landgraf et al. (47), como sigue:

15 Los cebadores se modifican con el éster biotinilamidocaproato-N-hidroxisuccinimida (Sigma) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) por el método de Landgraf et al. (48). Siguiendo la Parte B de la invención, el ensayo ELISA se lleva a cabo en placas de microtitulación revestidas con 1 microgramo/mililitro de avidina purificada por afinidad (13 U/mg, Sigma). Un microlitro del producto de amplificación final (o el producto de pos-digestión) se diluye con 50 microlitros de PBS-Twen, y luego se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos en el pocillo de la placa de microtitulación. Los cebadores no incorporados se eliminan por lavado con PBS-Twen. Las placas se incuban luego a temperatura ambiente durante 30 minutos después de añadir 50 microlitros por pocillo del conjugado anticuerpo anti-FITC-HRPO (Dakopatts) que es una dilución 1:500 con PBS-Twen. Después de esto, se añaden a cada pocillo 80 microlitros de una solución ELISA preparada a partir de un miligramo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma) disuelta en un mililitro de dimetilsulfóxido y diluida 1:10 con 50 milimoles de acetato de Na:ácido cítrico, pH 4,9, que tiene añadidos 3 microlitros de solución de H₂O₂ al 30% (vol/vol). Después de 2-5 minutos, la reacción se detiene añadiendo 80 microlitros de H₂SO₄ 2M. Luego se le la densidad óptica a 450 nm.

20 Métodos alternativos para la detección por ELISA que se pueden usar en la Parte C incluyen, pero sin limitación, métodos de detección inmunológicos que usan anticuerpos monoclonales específicos para híbridos de RNA/DNA, tales como los métodos de adaptación descritos por Coutle et al. (49), o por Bobo et al. (50), cuyas publicaciones también se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para su descripción de los métodos de detección identificados en dichas referencias.

30 Métodos alternativos para la detección por ELISA que se pueden usar en la Parte C incluyen, pero sin limitación, sistemas de detección comerciales tales como el sistema de señales SHARP (Digene Diagnostics, Inc.), y el inmunoensayo enzimático de DNA (DEIA), (GEN-ETI-K DEIA, Sorin Biomedica).

35 Métodos alternativos mediante los cuales el producto amplificado de la Parte B puede ser detectado en la Parte C incluyen, pero sin limitación, todos los métodos de detección por electroquimioluminiscencia, tales como por adaptación del método descrito por Blackburn et al. (51), o por DiCesare et al. (52), y todos los métodos que utilizan la tecnología de detección por transferencia de mancha inversa (53), y todos los métodos que utilizan cromatografía de líquidos de alta resolución.

Aplicaciones terapéuticas

40 La extracción de RNA extracelular asociado a, o derivado de, un tumor, desde plasma o suero, y la amplificación de dicho RNA o su correspondiente cDNA a niveles detectables, permite el análisis posterior u otra manipulación de dicho RNA, o del correspondiente cDNA, a partir de los cuales se consigue más utilidad clínica. En esta etapa opcional de la invención, el RNA extracelular amplificado o el correspondiente cDNA se analiza para definir las características o composición del tumor a partir del cual se origina el RNA. Se pueden usar cualquiera de diversos métodos, dependiendo de la información deseada, incluyendo secuenciación de ácidos nucleicos, espectroscopía incluyendo espectroscopía de RMN protónica, análisis bioquímico, y análisis inmunológico. En la realización preferida, se aísla el cDNA amplificado - por ejemplo recortando bandas de DNA de un gel de agarosa - se reamplifican, se clonan en un vector plásmido, por ejemplo el vector plásmido pGEM-T (Promega) y se secuencian usando un comercial, tal como Sequenase 2.0 (USB). El análisis para definir las características o la composición del RNA asociado a un tumor en plasma o suero, y por tanto el origen del tumor, proporciona una amplia variedad de utilidad clínica, incluyendo la descripción, caracterización o clasificación del tumor, si es conocido u oculto, tal como por el tejido de origen, por el tipo (tal como premaligno o maligno), fenotipo y genotipo, y por la descripción o caracterización del comportamiento del tumor, la fisiología y la bioquímica, de modo que se adquiera una comprensión de la invasividad del tumor, la propensión a metastatizar, y la sensibilidad o resistencia a diversas terapias, permitiendo con ello la predicción de la respuesta a una terapia en curso o planeada y, además, permitiendo la evaluación del pronóstico. La comparación de las características del RNA extracelular con biopsias o muestras quirúrgicas previas permite la evaluación adicional de la heterogeneidad o similitud del tumor en comparación con la muestra, y por tanto la evaluación de la recidiva del tumor.

Después de la extracción del RNA extracelular derivado de un tumor o asociado a un tumor desde el plasma o suero y la amplificación del correspondiente cDNA, el ácido ribonucleico (RNA) puede ser transcrito o preparado de nuevo a partir del DNA amplificado como una opción adicional. La transcripción de RNA se puede realizar empleando un cebador con una región promotora de RNA-polimerasa unida a la secuencia del cebador estándar del cDNA en una reacción de amplificación. El RNA se transcribe luego desde la región promotora unida. En la realización preferida, el cDNA amplificado se clona en un vector de expresión, y se transcribe el RNA. Además, como realización opcional preferida, el RNA se usa en una reacción de traducción *in vitro* para preparar proteínas asociadas al tumor o específicas del tumor o péptidos u oligopéptidos asociados, de acuerdo con métodos usualmente conocidos en la técnica (73-76). Adviértase que estas referencias citadas, y las que le siguen, se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para su descripción para realizar los diversos ensayos identificados en ellas.

La extracción del RNA extracelular derivado de un tumor o asociado a un tumor, su amplificación, caracterización y traducción a una proteína asociada a un tumor o específica de un tumor, proporciona una utilidad significativa, tanto en la asignación de terapia como en el desarrollo de terapias específicas del tumor. La secuenciación de RNA o cDNA permite la asignación o desarrollo de compuestos antisentido, incluyendo oligonucleótidos sintéticos y otras construcciones antisentido apropiadamente específicas para el DNA, tal como por construcción de un plásmido de expresión, tal como por adaptación del método de Aoki et al. (68) que se incorpora como referencia en su totalidad, o por otra construcción y uso como se describe en las referencias (77-81). Por tanto, la aplicación de la invención de este modo implicaría la extracción del RNA asociado a un tumor del plasma o suero, seguido por una etapa opcional transcripción inversa para obtener el cDNA, seguido por amplificación del RNA o cDNA. El producto amplificado puede ser secuenciado luego para definir la secuencia de ácido nucleico del RNA o cDNA asociado al tumor. Luego se construye un oligonucleótido antisentido, de tal modo como se ha referenciado anteriormente, específico para la secuencia definida o alternativamente, se determina que si es aplicable un compuesto antisentido ya preparado, o puede ser preparado cuando se conoce la secuencia basado en el conocimiento de la secuencia del cebador. Similarmente, definir las características del tumor por análisis de RNA extracelular permite la asignación de terapias con un anticuerpo monoclonal específico o vacuna apropiadamente específicos para el tumor. La producción de la proteína inmunológica correspondiente se puede usar en el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos del tumor. Por tanto, la aplicación de la invención de este modo implicaría la extracción del RNA asociado al tumor del plasma o suero, seguido por amplificación para obtener un producto amplificado asociado al tumor. El producto amplificado se traduce o se transcribe y traduce, en una proteína o péptidos u oligopéptidos asociados como se ha descrito previamente, proporcionando así un antígeno asociado a un tumor. El antígeno asociado a un tumor permite por tanto la producción de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno mediante el uso de la tecnología del hibridoma u otros métodos corrientemente practicados en la técnica (82). Dicho anticuerpo monoclonal puede adicionalmente ser conjugado con una toxina u otro agente terapéutico (83) o con un radionucleótido (84) para proporcionar un uso terapéutico o diagnóstico adicional dirigido contra el tumor. Similarmente, la proteína traducida o los péptidos u oligopéptidos asociados se pueden usar en el desarrollo de vacunas específicas del tumor. Además, el RNA extracelular y el DNA complementario permiten un medio de definir o permitir la construcción de un DNA que se puede usar en terapia vacunal. Específicamente la invención se aplica para definir u obtener proteínas o péptidos, RNA o cDNA asociados a un tumor, por métodos como los descritos previamente, y a partir de los cuales puede desarrollarse o construirse una vacuna dirigida a un tumor. Los métodos mediante los cuales la vacuna es desarrollada o construida posteriormente varían, pero son conocidos en la técnica (85-90), y están referenciados en la presente memoria en su totalidad.

Es de particular valor que la invención permite el desarrollo y la aplicación de estas terapias específicas de tumores incluso cuando solamente están presentes tumores premalignos. Por tanto, la invención permite la intervención terapéutica cuando la carga tumoral es baja, la función inmunológica está relativamente intacta, y el paciente no está comprometido, aumentando todo ello el potencial para la curación.

Ejemplos hipotéticos de la invención

En los ejemplos siguientes se presentan casos clínicos hipotéticos ilustrativos para demostrar el uso clínico potencial de la invención.

Caso 1

Un hombre hipotético asintomático de 26 años se presenta para evaluación después de saber que a su hermano mayor de 37 años se le hubiera diagnosticado recientemente cáncer de colon. Se le extrae sangre periférica para usar en la invención evaluando la presencia de mRNA extracelular de antígeno carcinoembrionario (CEA) en el plasma del paciente. El RNA extracelular del plasma se extrae durante la Parte A de la invención por el método de extracción con solución ácida de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo como se ha descrito previamente, seguido por amplificación cualitativa por RT-PCR en la Parte B de la invención usando cebadores del RNA de CEA como se ha descrito previamente. El ensayo de amplificación como se ha descrito previamente (58) se realiza en la parte B de la invención. El producto amplificado final se detecta por electroforesis en gel de agarosa al 3% en la Parte C de la invención. En este paciente los resultados son positivos lo que indica la presencia de mRNA de CEA en el plasma sanguíneo.

El CEA ha sido asociado con el cáncer colon. Aunque el cáncer de colon es altamente curable si se diagnostica en una fase temprana, es fatal cuando se diagnostica en fases metastásicas avanzadas. Los resultados positivos de la invención para este paciente, en el establecimiento de un historial familiar altamente positivo para cáncer de colon, sugieren cáncer de colon premaligno o maligno. Se recomienda que el paciente se someta a colonoscopia, y si no se le encuentran lesiones, se le debería realizar una vigilancia más frecuente que la normal.

Este caso hipotético ilustra cómo la invención se puede usar para escrutar cáncer en pacientes de alto riesgo, detectar si existen estados premalignos o malignos antes del estado metastásico y tomar una decisión en el manejo clínico. Aunque el mRNA de CEA está asociado con otros cánceres, tales como cáncer de hígado, la adición de un enfoque de panel múltiple usando la invención para detectar múltiples y diferentes RNA extracelulares asociados a tumores, incluyendo por ejemplo RNA de K-ras, P53, DCC y APC, facilita la clarificación, puesto que el mRNA de CEA está probablemente asociado a un tumor de colon, y además, si los hallazgos son consistentes con un tumor premaligno o maligno.

Caso 2

Una mujer hipotética de 33 años visita a su dermatólogo tras advertir "*un lunar sangrante*" en su espalda. La extirpación local diagnostica un melanoma maligno de una profundidad de 0,3 milímetros. Se le realiza una re-extirpación quirúrgica amplia, y se le comunica a la paciente que probablemente está curada y que no necesita más terapia. Tres meses después de la cirugía la paciente solicita una segunda opinión sobre la necesidad de más terapia. Se le extrae sangre periférica para evaluar, mediante la invención, en su plasma la presencia de RNA mensajero extracelular de tirosinasa. El RNA extracelular del plasma se extrae en la Parte A de la invención usando el método preferido del reactivo TRI como se ha descrito previamente, seguido por RT-PCR usando cebadores anidados para cDNA de tirosinasa en la Parte B de la invención como se ha descrito previamente, con detección por ELISA en la Parte C de la invención. Los resultados de la invención detectan la presencia de mRNA de tirosinasa en el plasma de la paciente. La tirosinasa es común tanto para los melanocitos normales como para los del melanoma maligno. Sin embargo, el mRNA de la tirosinasa no circula normalmente en la sangre, y su presencia en el plasma indica melanoma maligno latente. En consecuencia, se inicia en la paciente una terapia adyuvante con interferón-alfa. Empleando la invención se vigilan a continuación de un modo sistemático los niveles de RNA de tirosinasa extracelular en plasma de un modo cuantitativo. A la paciente se le extrae sangre cada dos meses, y se extrae el RNA extracelular del plasma en la Parte A de la invención usando el método de extracción con sílice que se ha descrito previamente. La amplificación por RT-PCR cuantitativa del mRNA de la tirosinasa se realiza luego en la Parte B de la invención usando un cebador biotinilado en detección basada en electroquimioluminiscencia en la Parte C de la invención. Los datos de la invención demuestran una elevación progresiva de los niveles de mRNA de tirosinasa extracelular en el plasma de la paciente. De acuerdo con estos datos se detiene la administración de interferón, y la paciente es enrolada en un protocolo de terapia adyuvante experimental.

Este caso hipotético ilustra diversos usos de la invención, incluyendo la detección de cáncer latente, la predicción del pronóstico y la recidiva del cáncer después de extirpación quirúrgica, lo que determina la necesidad de una terapia adicional, evaluando el beneficio de la terapia y la necesidad de cambiar las terapias, y evaluar el pronóstico del paciente en la terapia.

Caso 3

En un hombre hipotético de 76 años, sometido a técnicas de formación de imagen por escaneo mediante tomografía por ordenador (abreviadamente CT por la expresión inglesa *Computerized Tomography*) se aprecia que tiene una masa pancreática. La colonoscopia y el examen por rayos X de su tórax son normales. El paciente rechaza someterse a cirugía debido a los riesgos significativos que implica. Elige recibir una terapia específica de paciente posibilitada por el uso de la invención. Puesto que las mutaciones K-ras están presentes en 80-90% de los cánceres pancreáticos, usando la invención se le extrae sangre periférica para evaluarlas y caracterizar el RNA de K-ras mutante extracelular circulante en plasma. El RNA extracelular del plasma se extrae en la Parte A de la invención usando el método de extracción con el reactivo TRI como se ha descrito previamente, seguido por RT-PCR en la Parte B de la invención con detección por cromatografía de líquidos de alta resolución en la Parte C. Los productos de amplificación de K-ras mutante se separan luego después de la cromatografía y la mutación K-ras se secuencian usando técnicas estándares como se han descrito previamente. La detección del mRNA de K-ras mutante en el plasma confirma la probabilidad de que la masa pancreática sea un cáncer de páncreas. Se desarrolla una terapia específica del paciente (es decir, específica para el cáncer propio del paciente) basada en la secuencia de la mutación, en este caso una vacuna ras específica para el oncogén mutante de este cáncer pancreático del paciente. Alternativamente, la proteína específica K-ras mutante, generada como se ha descrito previamente, se puede usar para desarrollar un anticuerpo monoclonal específico del tumor.

En este caso hipotético, la invención se usa no sólo para ayudar a confirmar un diagnóstico sospechoso de cáncer pancreático, sino para desarrollar una terapia específica del paciente. Las terapias específicas de pacientes - es decir, terapias diseñadas específicamente para un cáncer dado de un paciente, o un tipo dado de cáncer - son posibles cuando se reconocen las características específicas del tumor. Puesto que la invención da como resultado la amplificación del producto del tumor puro, llega a ser posible caracterizar el tumor, en este caso usando el análisis de secuencia y/o la transcripción y la traducción. El salto tecnológico que supone la invención facilita que permita

que los tumores sean caracterizados sin necesidad de biopsia o cirugía. Por tanto, llega a ser posible tratar tumores incluso antes de que sean clínicamente evidentes, es decir, tratar en fases latentes, fases de pre-recidiva o incluso fases pre-malignas. El tratamiento temprano del cáncer antes de que las células metastásicas entren en el torrente sanguíneo aumenta la probabilidad de curación.

5 Caso 4

A una mujer hipotética de 36 años que tiene tres hijos pequeños en el hogar se le había diagnosticado cáncer de mama hacía dos años. Había sido tratada con cirugía seguida por seis meses de quimioterapia. Además, su suero sanguíneo había sido evaluado continuamente en cuanto a mRNA de queratina 19 extracelular usando la invención en el cual el mRNA de queratina 19 extracelular del suero se extrae en la Parte A de la invención usando el método 10 extracción con sílice, seguido por amplificación por RT-PCR en la Parte B de la invención con detección por ELISA en la Parte C de la invención. El mRNA de queratina 19 codifica una proteína filamentosa intermedia que no se encuentra normalmente en la sangre y que puede servir como marcador para el cáncer de mama. Aunque los resultados previos para esta paciente han sido negativos, mediante la invención su suero sanguíneo da ahora un resultado positivo en cuanto a mRNA de queratina 19 extracelular, lo que sugiere una inminente recidiva de cáncer. 15 Empleando la invención se lleva a cabo un panel múltiple para RNA de myc, ras, P53, EGFr, and Her-2-neu extracelular en suero. Este dato confirma que las características del tumor son idénticas a las del cáncer de mama original primario, confirmando una recidiva en lugar de un nuevo caso primario. Consecuentemente, se mide el mRNA de queratina 19 extracelular en suero de un modo cuantitativo usando un ensayo de amplificación de señal de DNA ramificado en la Parte B de la invención, realizándose las medidas 2 meses y 4 meses más tarde. Las 20 medidas cuantitativas indican niveles crecientes de mRNA de queratina 19, y permiten la extrapolación para predecir que la recidiva clínica se advertirá en aproximadamente 2 años. Esta información permite tanto al médico como al paciente planear opciones terapéuticas futuras en el contexto de la presente situación social y familiar del paciente.

Este caso hipotético ilustra el uso de la invención en monitorizar pacientes que siguen terapias para la recidiva de sus cánceres, determinar las características de sus tumores, y predecir el pronóstico. Los pacientes de cáncer de 25 mama tienen una alta incidencia de segundos primarios, pero la invención permite la delimitación entre cáncer primario frente a recidiva de cáncer usando el método de múltiples paneles para evaluar las características del tumor. Además, puesto que el análisis cuantitativo en la Parte B de la invención permite la clarificación del pronóstico, la paciente se encuentra en una mejor posición para planear la terapia dentro del contexto de su situación social/familiar. Finalmente, puesto que la invención permite la detección del RNA extracelular derivado del tumor, y no depende de la presencia de células cancerosas circulantes, la recidiva se puede detectar en una fase 30 muy temprana (en este hipotético caso 2 años antes de la detección clínica), lo que aumenta la probabilidad de lograr una terapia eficaz.

Bibliografía

1. Mori, M., Mimori, K., Inoue, H., et al.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 55:3417-3420, 1995. 35
2. Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., et al.: Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55:6040-6044, 1995.
3. Ozcelik, H., Mousses, S., Andrulis, I.L.: Low levels of expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CIP1/WAF1) in primary breast carcinomas with p53 mutations. *Clin Cancer Res* 1:907-912, 1995.
4. Smith, B., Selby, P., Southgate, J., et al.: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338:1227-1229, 1991. 40
5. Datta, Y.H., Adams, P.T., Drobyski, W.R., et al.: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12:475-482, 1994.
6. Moreno, J.G., Croce, C.M., Fischer, R., et al.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6110-6112, 1992. 45
7. Ghossein, R.A., Scher, H.I., Gerald, W.I., et al.: Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 13:1195-1200, 1995.
8. Reddi, K.K. and Holland, J.F.: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 73:2308-2310, 1976.
9. Leon, S.A., Shapiro, B., Servi, P., et al.: A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease. *Europ J Cancer* 17:533-538, 1981. 50
10. Juckett, D.A. and Rosenberg, B.: Actions of cis-diamminedichloroplatinum on cell surface nucleic acids in cancer cells as determined by cell electrophoresis techniques. *Cancer Res* 42:3565-3573, 1982.

11. Davidova, S.Y. and Shapot, V.S.: Liporibonucleoprotein complex as an integral part of animal cell plasma membranes. *FEBS Lett.* 6:349-351, 1970.
12. Rieber, M. and Bacalao, J.: An "external" RNA removable from mammalian cells by mild proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:4960-4964, 1974.
- 5 13. Taylor, D.D. and Blak, P.H.: Shedding of plasma membrane fragments. Neoplastic and developmental importance. In: *The Cell Surface in Development and Cancer, Develop Biol* Vol 3, pp. 33-57. Editor: M.S. Steinberg. Plenum Press, New York, London. 1985.
- 10 14. Barz, D., Goppelt, M., Szamel, M., et al.: Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasing lymphoma (Eb) and its metastasing variant (Esb). *Biochim. Biophys. Acta* 814:77-84, 1985.
- 15 15. Carr, J.M., Dvorak, A.M. and Dvorak, H.F.: Circulating membrane vesicles in leukemic blood. *Cancer Res* 45:5944-5951, 1985.
16. Rosi, A., Guidoni, L., Luciani, A.M., et al.: RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 39:153-160, 1988.
- 15 17. Masella, R., Cantafora, A., Guidoni, L., et al.: Characterization of vesicles, containing an acylated oligopeptide, released by human colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 246:25-29, 1989.
18. Mountford, C.E., May, G.L., Wright, L.C., et al.: Proteolipid identified by magnetic resonance spectroscopy in plasma of a patient with borderline ovarian tumor. *Lancet* i:829-834, 1987.
- 20 19. Wieczorek, A.J., Rhyner, C., Block, L.H.: Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3455-3459, 1985.
20. Wieczorek, A.J., Sitaramam, V., Machleidt, W., et al.: Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: First clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer Res* 47:6407-6412, 1987.
- 25 21. Wieczorek, A.J. and Rhyner, K.: Ein gensondentest fur RNA-proteolipid in serumproben bei neoplasie. *Schweiz med Wschr* 119:1342-1343, 1989.
22. Rosenberg-Nicolson, N.L. and Nicolson, G.L.: Nucleoprotein complexes released from lymphoma nuclei that contain the abl oncogene and RNA and DNA polymerase and RNA primase activities. *J Cell Biochem* 50:43-52, 1992.
- 30 23. Imai, H., Yamada, O., Morita, S., et al.: Detection of HIV-1 RNA in heparinized plasma of HIV-1 seropositive individuals. *J Virol Methods* 36:181-184, 1992.
24. Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., et al.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Micro* 28:495-503, 1990.
25. Cheung, R.C., Matsui, S.M. and Greenberg, H.B.: Rapid and sensitive method for detection of hepatitis C virus RNA by using silica particles. *J Clin Micro* 32:2593-2597, 1994.
- 35 26. Boom, R., Sol, C.J.A., Heijntink, R., et al.: Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *J Clin Micro* 29:1804-1811, 1991.
27. Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159, 1987.
- 40 28. Chomczynski, P.: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotech* 15:532-537, 1993.
29. Chomczynski, P. and Mackey, K.: Modification of the TRI reagent(TM) procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques* 19:942-945, 1995.
30. Chomczynski, P. and Mackey, K.: Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Analytical Biochemistry* 225:163-164, 1995.
- 45 31. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., et al.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979.
32. Fournie, G.J., Gayral-Taminh, M., Bouche, J.-P., et al.: Recovery of nanogram quantities of DNA from plasma and quantitative measurement using labeling by nick translation. *Analytical Biochemistry* 158: 250-256, 1986.

33. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., et al.: Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46:318-322, 1989.
34. Rashtchian, A.: Amplification of RNA. *PCR Methods Applic* 4:S83-S91, 1994.
- 5 35. Moore, R.E., Shepherd, J.W. and Hoskins, J.: Design of PCR primers that detect only mRNA in the presence of DNA. *Nucleic Acids Res.* 18:1921, 1991.
36. Buchman, G.W., Schuster, D.M. and Rashtchian, A.: Selective RNA amplification: A novel method using dUMP-containing primers and uracil DNA glycosylase. *PCR Methods Applic* 3:28-31, 1993.
37. Abravaya, K., Carrino, J.J., Muldoon, S., et al.: Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Research* 23:675-682, 1995.
- 10 38. Urdea, M.S., Wilber, J.C., Yeghiazarian, T., et al.: Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay. *AIDS* 7(suppl 2):S11-S14, 1993.
39. Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., et al.: NASBA(TM) isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virological Methods* 35:273-286, 1991.
- 15 40. Edmands, S., Kirk, J., Lee, A., et al.: Rapid RT-PCR amplification from limited cell numbers. *PCR Methods Applic* 3:317-319, 1994.
41. Brossart, P., Keilholz, U., Scheibenbogen, C., et al.: Detection of residual tumor cells in patients with malignant melanoma responding to immunotherapy. *J Immunotherapy* 15:38-41, 1994.
42. Kahn, S.M., Jiang, W., Culbertson, T.A., et al.: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 6:1079-1083, 1991.
- 20 43. Wang, A.M., Doyle, M.V. and Mark, D.F.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9717-9721, 1989.
44. Karet, F.E., Charnock-Jones, D.S., Harrison-Woolrych, M.L., et al.: Quantification of mRNA in human tissue using fluorescent nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 220:384-390, 1994.
- 25 45. Vandamme, A.-M., Van Dooren, S., Kok, W., et al.: Detection of HIV-1 RNA in plasma and serum samples using the NASBA amplification system compared to RNA-PCR. *J Virological Methods* 52: 121-132, 1995.
46. Nguyen, T.D.: Southern blot analysis of polymerase chain reaction products on acrylamide gels. *BioTechniques* 7:238-240, 1989.
- 30 47. Landgraf, A., Reckmann, B. and Pingoud, A.: Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Analytical Biochemistry* 198:86-91, 1991.
48. Landgraf, A., Reckmann, B. and Pingoud, A.: Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Analytical Biochemistry* 193: 231-235, 1991.
49. Coutlee, F., Bobo, L., Mayur, K., et al.: Immunodetection of DNA with biotinylated RNA probes: A study of reactivity of a monoclonal antibody to DNARNA hybrids. *Analytical Biochemistry* 181:96-105, 1989.
- 35 50. Bobo, L., Coutlee, F., Yolken, R.H., et al.: Diagnosis of chlamydia trachomatis cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Micro* 28:1968-1973, 1990.
51. Blackburn, G.F., Shah, H.P., Kenten, J.H., et al.: Electrochemi-luminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin Chem* 37/9:1534-1539, 1991.
- 40 52. DiCesare, J., Grossman, B., Katz, E., et al.: A high-sensitivity electrochemi-luminescence-based detection system for automated PCR product quantitation. *BioTechniques* 15:152-157, 1993.
53. Saiki, R.K., Walsh, D.S. and Erlich, H.A.: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Science* 233:1076-1078, 1989.
54. Komeda, T., Fukuda, Y., Sando, T. et al.: Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer* 75: 2214-2219, 1995.
- 45 55. Kamm, R.C., and Smith, A.G.: Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clinical Chemistry* 18: 519-522, 1972.

56. Chu, E., Takechi, T., Jones, K. L. et al.: Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 15: 179-185, 1995.
57. Stock, W., Westbrook, C. A., Peterson, B. et al: Value of molecular monitoring during the treatment of chronic myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncology* 15: 26-36, 1997.
- 5 58. Gerhard, M., Juhl, H., Kalthoff, H. et al.: Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* 12: 725-729, 1994.
59. Hoon, D.S.B., Wang, Y., Dale, P.S. et al.: Detection of occult melanoma cells in blood with a multiplex marker polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Oncol.* 13: 2109-2116, 1995.
- 10 60. Miller, W. H. Jr., Levine, K., DeBlasio, A. et al.: Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR-alpha fusion mRNA. *Blood* 82: 1689-1694, 1993.
61. Penno, M.B., August, J.T., Bayline, S.B. et al.: Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Research* 54: 1381-1387, 1994.
62. Pfeleiderer, C., Zoubek, A., Gruber, B. et al.: Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from ewing tumour patients by RT-PCR. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 64: 135-139, 1995.
- 15 63. Maruyama, F., Stass, S.A., Estey, E.H. et al.: Detection of AML1/ETO fusion transcript as a tool for diagnosing t(8; 21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 8: 40-45, 1994.
64. Patard, J-J., Brasseur, F., Gil-Diez, S. et al.: Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int. J. Cancer* 64: 60-64, 1995.
- 20 65. Doi, F., Chi, D.D., Charuworn, B.B et al.: Detection of beta-human chorionic gonadotropin mRNA as a marker for cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Cancer.* 65: 454-459, 1996.
66. Wiedmann, M., Wilson, W.J., Czajka, J. et al.: Ligase chain reaction (LCR) - overview and applications. *PCR Methods Appl.* 3: 551-64, 1994.
67. Sooknanan, R., Malek, L., Wang, X-H. et al.: Detection and direct sequence identification of BCR-ABL mRNA in Ph + chronic myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 21: 1719-1724, 1993.
- 25 68. Aoki, K., Yoshida, T., Sugimura, T. et al.: Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. *Cancer Res.* 55: 3810-3816, 1995.
69. Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
- 30 70. Feng, J., Funk, W.D., Wang, S-S., et al.: The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241, 1995.
71. Urdea, M.S., Horn, T., Fulte, T.J., et al.: Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Research Symposium Series* 24: 197-200, 1991.
72. Katz, A. E., DeVries, G. M., Begg, M.D. et al.: Enhanced Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Prostate Specific Antigen as an Indicator of True Pathologic Stage in Patients with Prostate Cancer. *Cancer* 75: 1642-1648, 1995.
- 35 73. Roggenbuck, B., Larsen, P. M., Fey, S. J. et al.: Human Papillomavirus Type 18 E6 and E6, and E7 Protein Synthesis in Cell Free Translation Systems and Comparison of E6 and E7 In Vitro Translation Products to Proteins Immunoprecipitated from Human Epithelial Cells. *J. Virol.* 65: 5068-72, 1991.
- 40 74. Dosaka, A. H., Rosenberg, R. K., Minna, J. D. et al.: A Complex Pattern of Translational Initiation and Phosphorylation in L-Myc Proteins. *Oncogene* 6: 371-378, 1991.
75. Alkema, M. J., Wiegant, J., Raap, A. K. et al.: Characterization and Chromosomal Localization of the Human Proto-Oncogene BMI-1. *Human Mol. Genet.* 2: 1597-1603, 1993.
- 45 76. Shen, R., Su, Z. Z., Olsson, C. A. et al.: Identification of the Human Prostate Carcinoma Oncogene PTI-1 by Rapid Expression Cloning and Differential RNA Display. *Proc. Natl. Acad., Sci. USA.* 92: 6778-6782, 1995.
77. Cohen, J.S.: Biochemical Therapy: Antisense Compounds. In: *Biologic Therapy of Cancer*, (DeVita, VT, Hellman S., Rosenberg, S. A., eds.) J. B. Lippincott, Co., Philadelphia, 1991, pp. 763-775.

78. Polushin, N. N. and Cohen, J. S.: Antisense Pro-Drugs: 5'-ester Oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 22: 5492-5496, 1994.
- 5 79. Sakakura, C., Hagiwara, A., Tsujimoto, H. et al.: Inhibition of Gastric Cancer Cell Proliferation by antisense Oligonucleotides Targeting the Messenger RNA Encoding Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Br. J. Cancer.* 70: 1060-1066, 1994.
80. Colomer, R., Lupu, R., Bacus, S. S. et al.: erbB-2 Antisense Oligonucleotides Inhibit the Proliferation of Breast Carcinoma Cells with erbB-2 Oncogene Amplification. *Br. J. Cancer.* 70: 819-825, 1994.
81. Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Nicolaidis, N.C. et al.: Suppression of Philadelphia Leukemia Cell Growth in Mice by BCR-ABL Antisense Oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4504-4508, 1994.
- 10 82. Schlom, J.: Antibodies in Cancer Therapy: Basic Principles of Monoclonal Antibodies. In: *Biologic Therapy of Cancer*, (DeVita, V.T., Hellman, S., Hellman, S., Rosenberg, S. A. eds.) J. B. Lippincott, Co., Philadelphia, 1991, pp. 464-481.
83. Vitetta, E. S., Thorpe, P. E.: Immunotoxins. In: *Biologic Therapy of Cancer*, (DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., eds.) J. B. Lippincott, Co., Philadelphia, 1991, pp. 482-495.
- 15 84. Larson, S. M., Cheung, N-K V., Leibel, S. A.: Radioisotope Conjugates. In: *Biologic Therapy of Cancer* (DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. eds.) J. B. Lippincott, Co., Philadelphia, 1991, pp. 496-511.
85. Hoover, H. C., Jr., Hanna, M. G., Jr.: Immunotherapy by Active Specific Immunization: Clinical Applications. In: *Biologic Therapy of Cancer* (DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. eds.) J. B. Lippincott, Co., Philadelphia, 1991, pp. 670-682.
- 20 86. McCabe, B. J., Irvine, K. R., Nishimura, M. I. et al.: Minimal Determinant Expressed by a Recombinant Vaccinia Virus Elicits Therapeutic Antitumor Cytolytic T Lymphocyte Responses. *Cancer Res.*, 55: 1741-1747, 1995.
87. Bauer, S., Heeg, K., Wagner, H. et al.: Identification of H-2Kb Binding and Immunogenic Peptides from Human Papilloma Virus Tumour Antigens E6 and E7. *Scand. J. Immunol.* 42: 317-323, 1995.
- 25 88. Bocchia, M., Wentworth, P. A., Southwood, S. et al.: Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class 1 Molecules. *Blood.* 85: 2680-2684, 1995.
89. Peoples, G. E., Goedegebuure, P. S., Smith, R. et al.: Breast and Ovarian Cancer-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Recognize the Same HER-2/Neu Derived Peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 432-436, 1995.
90. Yanuck, M., Carbone, D. P., Pendleton, C. D. et al.: A Mutant P53 Tumor Suppressor Protein is a Target for Peptide-Induced CD8+ Cytotoxic T-Cells. *Cancer Res.* 53: 3257-3261, 1993.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor en la fracción plasmática de la sangre de un ser humano o animal como ayuda en la detección, diagnóstico, monitorización, tratamiento o evaluación de estados premalignos, estando caracterizado dicho método por las etapas de:
- a) fraccionar plasma por centrifugación de sangre completa de un ser humano o animal;
 - b) extraer el RNA total de mamífero del plasma, una porción del cual comprende RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
 - 10 c) amplificar el RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor extraído, o su cDNA correspondiente, de un modo cualitativo o cuantitativo; y
 - d) detectar el RNA amplificado o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo.
2. Un método para detectar RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor en la fracción sérica de la sangre de un ser humano o animal como ayuda en la detección, diagnóstico, monitorización, tratamiento o evaluación de estados premalignos, estando caracterizado dicho método por las etapas de:
- 15 a) fraccionar suero de sangre completa de un ser humano o animal;
 - b) extraer el RNA total de mamífero del suero, una porción del cual comprende RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
 - c) amplificar el RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor extraído, o su cDNA correspondiente, de un modo cualitativo o cuantitativo; y
 - 20 d) detectar el RNA amplificado o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el RNA de mamífero es de plasma o suero de un ser humano con adenoma o displasia.
4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor se extrae del plasma o suero usando un método de extracción de RNA seleccionado de:
- 25 a) método de extracción por gelatina;
 - b) método de extracción por sílice, bolas de vidrio o tierra de diatomeas;
 - c) un método de extracción por reactivo TRI o similar, tal como TRIso_lv. TRIso_l o ISOGEN;
 - d) métodos de extracción basados en tiocianato de guanidinio ácido;
 - 30 e) centrifugación a través de un gradiente de cloruro de cesio o similar; y
 - f) métodos de extracción basados en fenol-cloroformo.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la amplificación se realiza por un método de amplificación de RNA, que incluye aquellos en los cuales el RNA se transcribe primeramente de modo inverso a cDNA, y en los cuales el cDNA se amplifica, seleccionado de:
- 35 a) reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa;
 - b) reacción en cadena de ligasa;
 - c) amplificación de señal de DNA ramificado;
 - d) moléculas indicadoras de RNA amplificables;
 - e) replicación Q-beta;
 - 40 f) amplificación basada en la transcripción;
 - g) amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos isoterms (NASBA);
 - h) cualquier otro ensayo de replicación de secuencias automantenido;
 - i) amplificación de DNA búmeran;

- j) activación del desplazamiento de cadenas;
- k) tecnología de sonda cíclica; y
- l) cualquier combinación o variación de los anteriores.
- 5 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la detección del RNA o cDNA amplificado se realiza por al menos un método de detección seleccionado del grupo que consiste en:
- a) electroforesis en gel;
- b) detección por ELISA, incluyendo modificaciones, que incluyen cebadores biotinilados o modificados de otro modo, y métodos de detección inmunológicos que emplean anticuerpos monoclonales;
- 10 c) sonda fluorescente o cromógena marcada;
- d) análisis por transferencia de Southern;
- e) electroquimioluminiscencia;
- f) detección por transferencia de mancha inversa; y
- g) cromatografía de líquidos de alta resolución.
- 15 7. Un método para monitorizar o evaluar una enfermedad premaligna en un ser humano o animal, estando caracterizado dicho método por las etapas de:
- a) fraccionar plasma por centrifugación de sangre completa de un ser humano o animal,
- b) analizar el RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor en el plasma por:
- 20 1) extracción del RNA total del plasma, una porción del cual comprende RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
- 2) amplificación del RNA de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor extraído o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo;
- 3) detección de la presencia o ausencia del RNA amplificado o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo; y
- 25 c) repetir opcionalmente el ensayo de la etapa a) en serie.
8. Un método de monitorizar o evaluar una enfermedad premaligna en un ser humano o animal, estando caracterizado el método por las etapas de:
- a) fraccionar suero de sangre completa de un ser humano o animal,
- b) analizar en el suero el RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor por:
- 30 1) extracción del RNA total del suero, una porción del cual comprende RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
- 2) amplificación del RNA de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor extraído o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo;
- 35 3) detección de la presencia o ausencia del RNA amplificado o su cDNA correspondiente de un modo cualitativo o cuantitativo; y
- c) repetir opcionalmente el ensayo de la etapa a) en serie.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque se proporciona un método para:
- a) evaluación de la respuesta a la terapia, tal como terapia quirúrgica, quimioterapia, terapia por radiación, terapia hormonal, inmunoterapia o bioterapia;
- 40 b) indicación y medida del progreso de la enfermedad;
- c) indicación y medida de la recidiva de la enfermedad;
- d) indicación y predicción del pronóstico;

- e) indicación y medida de una enfermedad residual; y
- f) determinación de la necesidad de terapia adicional o evaluación del beneficio de la terapia o evaluación de la necesidad de cambiar la terapia.
- 5 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el RNA o cDNA de mamífero amplificado de la subetapa (b) puede ser caracterizado además por uno o más de los siguientes:
- a) secuenciación de ácidos nucleicos,
- b) espectroscopía,
- c) análisis inmunológico;
- d) análisis bioquímico;
- 10 e) producción del RNA correspondiente; o
- f) producción de la proteína correspondiente.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como ayuda en el diseño de un programa de tratamiento de pacientes, que incluye la asignación o desarrollo de terapias específicas de tumores, incluyendo terapia por vacunas, terapia por anticuerpos monoclonales y terapia por moléculas antisentido.
- 15 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, aplicado a la detección en plasma de múltiples especies de RNA extracelular de mamífero asociado a un tumor, estando caracterizado el método por las etapas de:
- a) extraer de plasma múltiples especies de RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
- 20 b) amplificar las especies de RNA extracelular de mamífero extraídas o su cDNA de un modo cualitativo o cuantitativo; y
- c) detectar el RNA o su cDNA amplificado de un modo cualitativo o cuantitativo.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, aplicado a la detección en suero de múltiples especies de RNA extracelular de mamífero asociado a un tumor, estando caracterizado el método por las etapas de:
- 25 a) extraer de suero múltiples especies de RNA extracelular de mamífero derivado de un tumor o asociado a un tumor;
- b) amplificar las especies de RNA extracelular de mamífero extraídas o su cDNA de un modo cualitativo o cuantitativo; y
- c) detectar el RNA o su cDNA amplificado de un modo cualitativo o cuantitativo.